OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | Study of haze-komi and metabolite distribution relation in rice koji by the combination of metabolomics and imaging techniques |
| Author(s) | Wisman, Putri Adinda |
| Citation | 大阪大学, 2021, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/82198 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

# Abstract of Thesis

| Name （ADINDA PUTRI WISMAN） | |
|---|---|
| Title | Study of *haze-komi* and metabolite distribution relation in rice *koji* by the combination of metabolomics and imaging techniques<br>(メタボロミクスとイメージング技術の組み合わせによる米麹のハゼコミと代謝物分布の関係に関する研究) |


Rice *koji*, made by inoculating *Aspergillus oryzae* on steamed rice, is an important material involved in the production of various fermented products, such as *sake*, *mirin*, *miso*, and others. As such, the examination of rice *koji* features is essential for the overall production process. One feature of rice *koji* is the presence of *haze*, the white areas on the surface of rice that represents the existence of fungal mycelia. The degree of mycelial penetration, also known as *haze-komi*, is thought to have a high correlation with the content of rice *koji*. However, the connection between haze-komi profile and the metabolite content is not well understood. Hence, metabolite level studies related to *haze-komi* is a topic of interest in the brewing industry. To facilitate the required study, it is necessary to improve the conventional visualization of *haze-komi* profile. In addition, a correlation study between *haze-komi* profile and the component profile inside rice *koji* would be expected.

Thus, the objective of this study is to observe the trend of *haze-komi* and metabolites alteration during rice *koji*-making. Time-course analysis of rice *koji* using the combination of metabolomics and imaging techniques was planned to achieve this objective. First, ß-glucuronidase (GUS) reporter system was used for *haze-komi* visualization. Then, metabolic profiling was conducted to obtain information on the metabolic changes during the rice *koji*-making process. Finally, mass spectrometry imaging (MSI) was utilized to observe the distribution profile of metabolites selected by time-course metabolome analysis of rice *koji* during the process.

In the first step of this study, an alternative for mycelia visualization was presented through the use of GUS histochemical staining. An *A. oryzae* strain that can express GUS was utilized to make rice *koji*, which in turn was used for the observation of *haze-komi* during the rice *koji*-making process. Optimization of the preparation method such as sample sectioning and incubation method was conducted. With the optimized method, clear visualization was achieved for the observation of *haze-komi* on a cross-section of rice *koji*. The method was applied to time-course samples of rice *koji*, revealing the extent of mycelial penetration at specific time points during the rice *koji*-making process.

In the next chapter, the rice *koji* used during the previous chapter was subjected to untargeted metabolite profiling using GC-MS as well as amino acids and other amines profiling by LC-MS. The time course profiling revealed the changes of sugars, sugar alcohols, amino acids, organic acids, polyamines, and other metabolites during the rice *koji*-making process. Most of the metabolites were significantly changed during the *koji*-making, with several sugars, amino acids, and other amine metabolites showing the highest relative intensity in different timing. The results obtained confirmed the effects of *A. oryzae* inoculation towards metabolite production, as well as adding another perspective through the analysis of other amines such as polyamines during rice-*koji* making.

MSI technique is then used to investigate the effect of *haze-komi* towards the metabolite changes during rice *koji*-making, as visual data is required to compare with the profile of mycelial penetration. The same samples from previous chapters were used for the imaging of metabolites in rice *koji*. Sugars, sugar alcohols, amino acids, and other amines were focused in this study, as these metabolites showed the most changes between classes. The imaging results were compared with GUS histochemically-stained rice *koji* images. Sugars, sugar alcohols and other amines were not shown to not be correlated with extent of mycelial penetration, while most amino acids seem to be correlated with *haze-komi*. Additionally, various amino acids showed different distribution compared with each other in certain time points. From these results, it was revealed that *haze-komi* progression is related to the distribution of specific metabolites inside rice *koji* to some degree.

The combination of metabolomics and imaging techniques successfully accumulated knowledge about the trend of *haze-komi* and metabolites alteration during the rice *koji*-making process. This is the first report that correlated the degree of *haze-komi* with the profile of metabolites inside the rice *koji*. The approach used in this thesis demonstrated how mass spectrometry imaging can facilitate the study to understand the events or mechanisms that occurs during rice *koji*-making process. Additionally, the presented method is applicable for further investigation on factors related to *haze-komi*, such as the moisture content or the polishing rate of rice.

様式 7

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏　名 | （ADINDA PUTRI WISMAN ） | |
|---|---|---|
| | （職） | 氏　名 |
| 論文審査担当者 | 主 査　教 授 | 福崎　英一郎 |
| | 副 査　教 授 | 村中　俊哉 |
| | 副 査　教 授 | 藤山　和仁 |
| | 副 査　教 授 | 渡邉　肇 |
| | 副 査　教 授 | 紀ノ岡　正博 |
| | 副 査　教 授 | 内山　進 |
| | 副 査　教 授 | 永井 健治 |
| | 副 査　教 授 | 大政　健史 |
| | 副 査　教 授 | 本田 孝祐 |
| | 副 査　教 授 | 栗栖 源嗣 |

## 論文審査の結果の要旨

蒸米に*Aspergillus oryzae*を接種して作られる米麹は，日本酒，みりん，味噌などの発酵製品の製造に関わる重要な原料である．そのため，米麹の特徴を調べることは，生産工程全体にとって必須である．米麹の特徴の一つに，ハゼという米の表面に白い部分が存在してあり，菌糸の浸透度は「ハゼコミ」とも呼ばれ，米麹の含量と高い相関関係があると考えられている．しかし，ハゼコミの状態と代謝物の含量との関連性は不明な点が多い．したがって，ハゼコミに関連する代謝物の研究は，醸造業界にとって大きなインパクトがある．この研究を達成するには，より詳細なハゼコミプロファイルの可視化手法を開発する必要がある．それと共に，米麹内部の成分プロファイルとの相関関係の研究行う必要がある．

そこで，本研究の目的は，米麹製造時のハゼコミと代謝物の変化の傾向を観察することである．この目的のために，代謝物の網羅的観測であるメタボロミクス分析とイメージング技術を組み合わせた米麹の経時変化解析を行った．具体的には，β-グルクロニダーゼ（GUS）レポーターシステムを用いてハゼコミを可視化し，得られた米麹のメタボリックプロファイリングを実施することで，米麹製造過程における代謝変化に関する情報を得た．最後に，代謝物の分布が可視化可能な質量分析イメージング（MSI）を用いて，米麹のメタボリックプロファイリングで選択された代謝物の製麹過程における分布を観察した．

GUS組織化学染色を用いて菌糸体の可視化を行うにあたり，GUSを発現する*A. oryzae*株を用いて製麹し，その製麹過程でのハゼコミの観察に使用した．試料の分取や培養方法などの調製方法の最適化を行うことにより，米麹の断面におけるハゼコミの様子が明確に可視化された．この方法を米麹の経時変化試料に適用することで，米麹の製麹過程の特定の時点での菌糸の浸透度を明らかにすることが可能となった．

次章では，前章で使用した米麹を用いて，GC-MSを用いた非標的代謝物プロファイリングと，LC-MS を用いたアミノ酸およびその他アミン類のプロファイリングを行った．製麹の経時変化により，米麹内における糖類，糖アルコール，アミノ酸，有機酸，ポリアミンなどの代謝物の変化を明らかにした．ほとんどの代謝物は製麹中に有意に変化し，いくつかの糖類，アミノ酸，その他のアミン代謝物は，異なるタイミングで最も高い相対的強度を示した．これらの結果から，*A. oryzae*の接種が代謝物生成に及ぼす影響を確認するとともに，ポリアミンなどの他のアミン類の分析を通じて，米麹製造過程における新たな視点を加えた．

菌糸体浸透のプロファイルと比較するには，視覚的なデータが必要となる．したがってMSIを用いて米麹製造中の代謝物変化に対するハゼコミの影響を調べた．米麹中の代謝物のイメージングには，前章で最も変化を示す糖類，糖アルコール，アミノ酸，またはその他のアミン類に着目した．可視化された分子分布像は，GUS組織化学的に染色した米麹の画像と比較した．糖類，糖アルコール，その他のアミン類は，菌糸浸透の程度とは相関しないことが示されたが，ほとんどのアミノ酸はハゼコミと相関している傾向が見られた．また，様々なアミノ酸が特定の時点で互いに異なる分布を示していた．これらの結果から，ハゼコミの進行は米麹内部の特定の代謝物の分布とある程度相関していることが明らかになった．

メタボロミクスとイメージング技術の組み合わせにより，製麹過程におけるハゼコミと代謝物の変化の傾向に関する知見を得ることに成功した．本論文で用いた手法は，MSIが米麹製造過程で生じる事象やメカニズムを理解するための研究を容易にすることを示した．また，本研究で得られた手法は，米麹の水分量や精米歩合など，ハゼコミに関連する要因の解明にも応用可能であると期待される．

以上より，本論文は博士論文として価値あるものと認める．